

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00387

小鼠四倍体早期胚胎基因组甲基化模式

员新旭¹, 冯书堂¹, 潘登科¹, 窦红伟^{1,2}, 牟玉莲¹, 李奎¹

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 畜禽遗传资源与利用农业部重点开放实验室, 北京 100193;
2. 甘肃农业大学动物医学院产科室, 兰州 730070

摘要: 利用小鼠抗 5-甲基胞嘧啶(5MeC)单克隆抗体检测了体外培养小鼠四倍体早期胚胎的基因组甲基化模式。结果表明: 利用电融合方法制备的小鼠四倍体胚胎在体外培养体系中经历细胞质融合、细胞核融合及细胞继续分裂发育直到囊胚期的过程, 在细胞质融合的时候胚胎卵裂球同体内体外培养二倍体胚胎一样, 呈现高度甲基化状态; 在细胞核开始融合的时候, 甲基化水平急速下降, 在细胞核完全融合的时候甲基化水平达到最低点; 随着胚胎继续分裂, 胚胎甲基化水平逐渐增加, 在桑葚胚期甲基化水平最高; 但是囊胚期四倍体胚胎内细胞团同滋养层细胞甲基化荧光信号没有差别, 这与体内体外培养二倍体囊胚内细胞团细胞甲基化荧光强度高于滋养层细胞甲基化荧光强度不同。因此, 小鼠体外培养四倍体胚胎的甲基化模式是不正常的, 这可能是四倍体小鼠难以发育到妊娠足月的原因之一。这是对小鼠四倍体早期胚胎基因组甲基化模式的首次报道。

关键词: 小鼠; 四倍体胚胎; 甲基化; 抗 5-甲基胞嘧啶抗体

DNA methylation patterns of mouse tetraploid embryos

YUN Xin-Xu¹, FENG Shu-Tang¹, PAN Deng-Ke¹, DOU Hong-Wei^{1,2}, MU Yu-Lian¹, LI Kui¹

1. Key Laboratory for Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture of China, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. Department of Obstetric, College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: In the present study, the DNA methylation patterns of in vitro-derived mouse tetraploid embryos were investigated by immunofluorescence staining with an antibody against 5-methylcytosine (5MeC). Tetraploid embryos could be produced by electrofusion at the stage of two-cell embryos, which could develop to blastocysts followed by fusion of cytoplasm and nucleus and cleavage in vitro. During the fusion of cytoplasm, the DNA methylation levels of the fused embryos are as high as these of two-cell diploid embryos in vivo. Then the embryos are rapidly demethylated when the nucleus begin to fuse, resulting in the lowest DNA methylation levels when the nucleus are fused completely. After that, the DNA methylation levels of the fused embryos are gradually increased until the morula stage. However, whereas an asymmetric distribution of DNA methylation is established in vivo-derived blastocysts with a higher methylation level in the inner cell mass (ICM) than that in the trophoblast, we can not detect the asymmetric distribution in most in vitro-derived tetraploid blastocysts. So the DNA methylation patterns of mouse tetraploid embryos are aberrant, which may lead to subsequent developmental failure and embryo death. This is the first report on the methylation patterns of in vitro-derived mouse tetraploid embryos.

Keywords: mouse; tetraploid embryos; methylation; antibody against 5-methylcytosine

收稿日期: 2008-10-23; 修回日期: 2008-11-27

基金项目: 国家高技术研究与发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA0110Z1039)和国家自然科学基金项目(编号: 30871775)资助

作者简介: 员新旭(1980-), 男, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: yunxinxu@tom.com

通讯作者: 李奎(1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: kuili@iascaas.net.cn

多倍体发育现象在低等动物,尤其是在两栖类、爬行类、鱼类等无脊椎动物中普遍存在,而在哺乳动物中,多倍体往往发育到胚胎早期就死亡了,因此在自然界中很少存活^[1]。人工制作多倍体的方法在植物界广泛应用,并且创造出了许多新品种,而利用人工制作多倍体哺乳动物来试图创造新品种的研究却举步维艰。1973年, Snow等^[2]用细胞松弛素B制作小鼠四倍体胚胎并移植成功获得3个四倍体小鼠,但以后再没有人重复出来他的结果。因此,人工诱导获得的四倍体胚胎能否发育到妊娠足月仍然具有争议。但是,在自然界中却存在能够正常发育的四倍体哺乳动物红维士卡奇鼠(*Tympanoctomys barrerae*) ($4n = 102$)^[3]。如果通过改进技术能够使哺乳动物四倍体胚胎发育并完成妊娠,甚至成活出生对培育哺乳动物新品种具有重要的意义。科学家对哺乳动物四倍体胚胎发育能力进行了大量的研究,四倍体早期胚胎细胞染色体核型不正常、囊胚细胞数少、细胞相对较大被认为是影响其正常发育的原因^[4,5],但确切的机制仍然不清楚。当四倍体胚胎细胞与一定数量的二倍体胚胎细胞进行嵌合的时候,四倍体胚胎细胞表现出向胚外组织发育的倾向性分布的特点^[6],具体原因需要进一步研究。因此,有关哺乳动物多倍体发育能力的研究仍然具有很大的研究空间。

DNA甲基化是哺乳动物一种重要的表观遗传修饰,主要发生在基因组CG二核苷酸的胞嘧啶上。DNA甲基化与基因的转录抑制有关,参与调节基因的组织特异性表达、X染色体失活、基因印迹和染色质结构等生物功能^[7-9]。小鼠正常早期胚胎在着床前有着特殊的基因组甲基化变化模式,在小鼠合子中,父本基因组在受精后不久就发生快速的主动去甲基化过程^[10,11],而母本基因组则在随后的卵裂过程中经历逐渐的依赖与DNA复制的被动去甲基化^[12]。这种DNA去甲基化变化一直持续到桑椹胚时期,到囊胚期的时候开始出现内细胞团高度甲基化而滋养层低甲基化的差异分布现象。研究表明,早期胚胎异常的DNA甲基化模式可能是导致早期胚胎不能正常发育的原因之一^[13,14]。哺乳动物四倍体早期胚胎不能正常发育可能与其DNA甲基化模式有很大关系,目前还没有有关小鼠四倍体早期胚胎DNA甲基化方面的报道。因此,我们利用抗5-甲基胞嘧啶抗体对

小鼠四倍体附植前早期胚胎的甲基化模式进行了检测,得到了一些新的发现。这些发现对进一步研究和理解基因组甲基化在细胞融合和四倍体胚胎发育过程中的作用有一定的意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~12周龄ICR小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠饲养环境温度25℃,相对湿度50%~60%,光照14 h/d,自由采食、饮水。

1.2 方法

1.2.1 2-细胞期胚胎的收集

实验采用超数排卵收集小鼠2-细胞期胚胎。选择处于间情期雌鼠于17:00腹腔注射10 IU孕马血清促性腺激素(PMSG,浙江省宁波激素有限公司),46~48 h后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(hCG,浙江省宁波激素有限公司)并与同系繁殖性能良好的雄鼠1:1合笼,次日早上8:00检查阴栓,有阴栓的雌鼠假定为受孕。注射hCG 46~48 h后颈椎脱臼法处死有阴栓小鼠,在解剖显微镜下从输卵管内用M2冲胚液冲出2-细胞期胚胎,洗涤2~3次后放入盖有石蜡油的M2微滴中备用。

1.2.2 制备小鼠四倍体胚胎

采用电融合的方法生产四倍体胚胎。将2-细胞期胚胎用融合液(0.25 mol/L Mannitol + 0.1 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)洗涤3次并平衡3~5 min后移入加好100 μL 融合液的电融合槽两极,用细拨针调整胚胎分裂球位置,使两分裂球接触面与融合槽两极平行。使用融合电压100 V/mm,脉冲时程30 μs ,脉冲次数2次,电击融合胚胎。处理后的胚胎在培养液中洗涤2~3次,移入覆盖有石蜡油的KSOM培养液微滴中培养,2 h后观察融合胚胎,弃除未融合的胚胎,融合后的胚胎将在24 h左右发育到4-细胞期。

1.2.3 基因组甲基化检测

实验采用免疫组织化学的方法检测胚胎基因组甲基化模式。分别收集处于发育不同阶段的早期四倍体胚胎,参照文献^[13]对胚胎进行固定和免疫荧光染色。从培养液中吸出早期胚胎,在PBS中洗涤

2~3次,然后用0.5%链酶蛋白酶溶液去除胚胎透明带并在含有0.1%PVA的PBS中洗涤2~3次,转移到4%多聚甲醛中4固定1~7d。固定好的胚胎用含有0.1%PVA的PBS液中洗涤3次,每次10min,接着在1%TritonX-100中室温通透30min。在含有0.1%PVA的PBS液中洗涤3次,每次10min,在2mol/L的HCl中室温处理30min。继续在含有0.1%PVA的PBS液中洗涤3次,每次10min,转移到2%BSA的PBS中封闭2h。然后把胚胎放入1:500稀释的抗5-甲基胞嘧啶抗体(Epigentek Group Inc)中37℃孵育2h,充分洗涤后转移到1:2000稀释的FITC偶联的抗小鼠二抗(博奥森生物科技有限公司)中37℃孵育1.5h。在含有0.1%PVA的PBS液中洗涤3次,每次10min后,胚胎转移到10μg/mL的PI(propidium didide)中染色10min,充分洗涤后固定在载玻片上进行观察。

1.2.4 免疫荧光观察

实验使用激光共聚焦显微镜(Confocal, ZEISS LSM510)下对胚胎染色进行观察,激发光波长为488nm(FITC)和568nm(PI),在相同参数下捕获的图像进行分析。

1.2.5 荧光相对定量分析

利用软件ImageJ 1.37V对捕获的图像进行分析。首先对图片进行去除背景色处理,手工圈定每个卵裂球核区范围,并用软件对总荧光强度进行测定。在囊胚的图片中,随机选取内细胞团与滋养层单个细胞进行测量。对荧光定量分析获得的数据进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 融合过程中胚胎基因组甲基化模式

50V融合电压作用后,小鼠2-细胞胚胎在

KSOM培养液中30min之内两个卵裂球开始融合,但融合的只是细胞质。经过60min左右,2-细胞融合成一个细胞,此时细胞核开始融合。再经过60min左右,细胞核基本完全融合。2h时候,融合后的胚胎开始继续分裂(图1, A~D)。实验过程中,选择细胞质融合时的胚胎、细胞核开始融合时的胚胎、细胞核正在融合的胚胎、细胞核完全融合的胚胎进行抗5-甲基胞嘧啶抗体染色。结果发现,细胞质刚开始融合的胚胎荧光信号非常的强,类似与体内2-细胞胚胎和只经过电击而没有融合的胚胎甲基化荧光信号(图2, A);融合成一个细胞时胚胎荧光信号开始减弱,细胞核即将融合的胚胎荧光信号更弱,到细胞核完全融合的时候,荧光信号最弱(图2, B~D)。这说明融合过程中胚胎的两个细胞核基因组甲基化模式经历着快速的去甲基化过程。

2.2 卵裂期胚胎基因组甲基化模式

细胞质与细胞核完全融合的四倍体胚胎继续发育,到4-细胞后期开始致密化,相当与体内二倍体胚胎8-细胞后期。取发育不同阶段胚胎进行甲基化检测发现,四倍体早期胚胎发育过程中的甲基化模式跟体内二倍体甲基化模式(图3, A~D)有很大的差异。随着胚胎发育,体内不同阶段早期胚胎卵裂球基因组甲基化水平在8-细胞与桑葚胚明显降低,不同阶段的四倍体胚胎卵裂球信号逐渐增强,到桑葚期胚胎信号最强(图3, F~I)。2-细胞期四倍体胚胎比融合的1-细胞期四倍体胚胎甲基化信号强一些,但比体内与体外培养二倍体2-细胞、4-细胞期胚胎荧光信号弱的多。为了避免视觉造成的误差,对早期发育不同时期早期胚胎进行荧光相对定量分析(图4),得出了相同的结论。

2.3 囊胚期胚胎基因组甲基化模式

分别对体内体外培养二倍体、体外培养四倍体囊胚进行抗5-甲基胞嘧啶抗体免疫荧光染色,我们

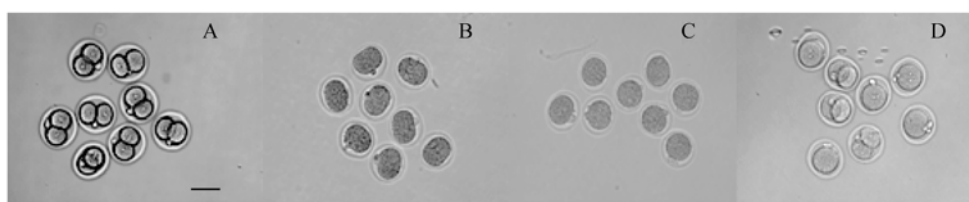


图1 小鼠体内2-细胞胚胎融合及分裂过程

A: 体内2-细胞胚胎; B: 细胞质融合胚胎; C: 细胞核融合胚胎; D: 开始和已经卵裂胚胎。标准比例尺: 100μm。

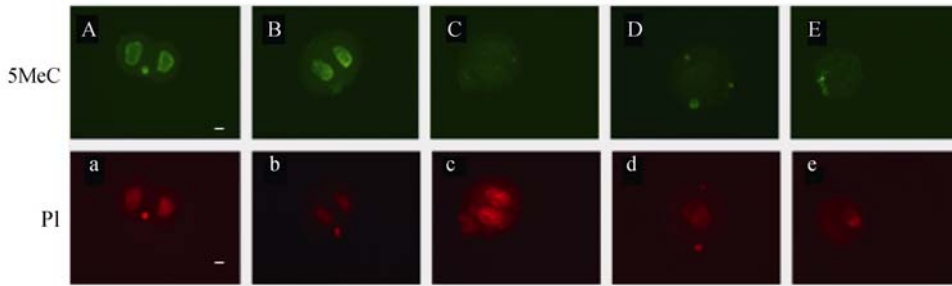


图 2 小鼠胚胎细胞融合过程中甲基化模式

A~E 为不同阶段胚胎 5MeC 染色(绿色)。A: 没有融合时胚胎; B: 细胞质融合时胚胎; C: 细胞核开始融合时胚胎; D: 细胞核正在融合时胚胎; E: 细胞核完全融合时胚胎。A~e 是 PI 染色(红色), 表示 A、B、C、D、E 阶段的细胞核。标准比例尺为 20 μm 。

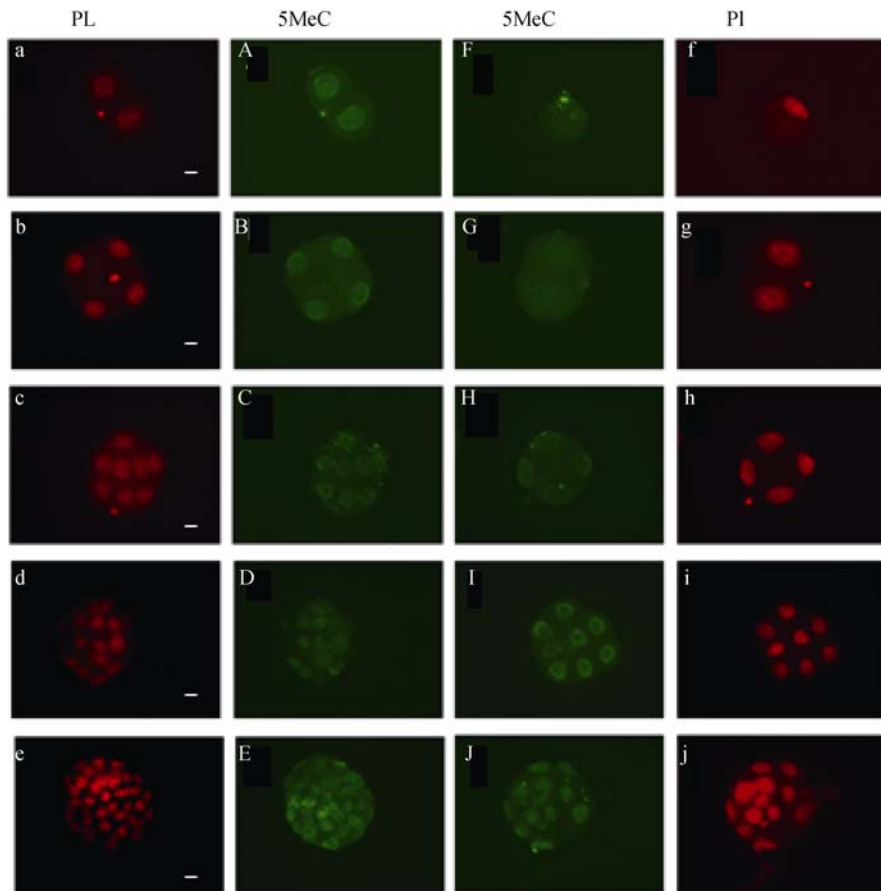


图 3 小鼠体内二倍体和体外四倍体卵裂期与囊胚期胚胎基因组甲基化模式

A~E 为小鼠体内二倍体胚胎不同时期 5MeC 染色(绿色)。A: 2-细胞二倍体胚胎; B: 4-细胞二倍体胚胎; C: 8-细胞二倍体胚胎; D: 桑葚期二倍体胚胎; E: 囊胚期二倍体胚胎。F~J 为体外四倍体胚胎不同时期 5MeC 染色(绿色)。F: 1-细胞期四倍体胚胎; G: 2-细胞期四倍体胚胎; H: 4-细胞期四倍体胚胎; I: 桑葚期四倍体胚胎; J: 囊胚期四倍体胚胎; a, b, c, d, e, f, g, h, i, j 是 PI 染色(红色), 分别表示 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 时期的细胞核。标准比例尺为 20 μm 。

发现, 体内体外培养二倍体囊胚同体外培养四倍体囊胚平均甲基化荧光强度没有差别, 但体内体外培养二倍体囊胚内细胞团(ICM)细胞比滋养层(TE)细

胞甲基化荧光信号强(图 3, E), 而四倍体囊胚内细胞团同滋养层细胞甲基化荧光信号没有差别(图 3, J)。

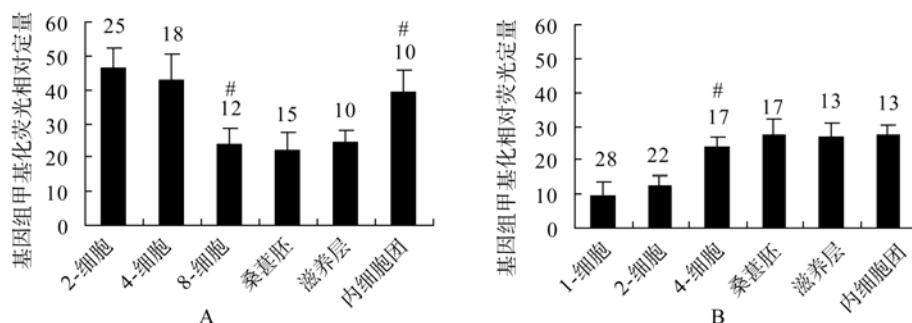


图4 小鼠体内二倍体(A)与体外四倍体(B)早期胚胎基因组甲基化荧光相对定量

每个柱子代表不同发育阶段胚胎卵裂球基因组甲基化荧光相对强度; 囊胚期单独分出内细胞团(ICM)和滋养层(TE)进行定量; # 代表与这一时期以前各时期比较极其显著($P < 0.05$); 柱子上数字代表胚胎数量。

3 讨论

利用抗 5-甲基胞嘧啶抗体检测早期胚胎基因组甲基化是一种特异性非常强的有效而简便的免疫组织化学方法。利用这一成熟的方法, 不同实验室得出了相同的结论, 即小鼠卵母细胞受精不久, 雄原核即开始发生主动去甲基化^[10, 11], 在利用抗 5-甲基胞嘧啶抗体检测时, 雌原核荧光强度很亮而几乎看不到雄原核的荧光。利用电融合的方法来制作四倍体胚胎时, 瞬间的电流使细胞膜发生可逆性的电穿孔, 细胞膜相互融合并诱导细胞质融合, 最终细胞核融合(图 1, A~D)。这种方法获得的胚胎, 几乎 90% 的囊胚为四倍体胚胎, 所以用这种方法获得四倍体胚胎做为实验材料是可靠的^[11]。对不同阶段的电融合胚胎进行基因组甲基化检测, 我们惊奇的发现, 2-细胞期胚胎的两个卵裂球在融合过程中细胞核发生了逐步的去甲基化, 在细胞核完全融合的时候, 几乎观测不到甲基化荧光信号(图 2, A~D)。这与受精不久雄原核发生主动去甲基化的现象不谋而和, 不同的是, 卵裂球融合后两个细胞核同时发生去甲基化并达到最低水平而受精卵只有雄原核去甲基化而两个原核融合后甲基化程度仍然很高。这可能是电融合使胚胎发生了这种不正常的DNA甲基化变化, 通过设计实验, 使胚胎在融合的时候, 两个分裂球接触面与融合槽的两极垂直, 卵裂球只接受电激而不融合, 通过检测发现两个卵裂球细胞核甲基化程度并没有发生变化, 从而排除了电融合的影响因素。可以推测, 2-细胞期二倍体胚胎细胞在融合的过程中发生了我们还不能解释的化学反应, 这种反应导致了细胞核逐步的去甲基化。在小鼠合子中, 受精后不久雄原核就发生主动的去甲基化现象至今我

们不能解释其中的原因。我们推测也许是雌雄原核融合过程中雄原核为适应新的环境作出的有效反应, 而 2-细胞期二倍体胚胎经过电融合的细胞核也许为了相互适应新的环境做出了同样的反应。另外, 大鼠、牛、猪等动物^[15]发生了同小鼠雄原核一样的主动去甲基化过程, 但在兔子、绵羊、人等动物^[16, 17]的雄原核并没有发生主动的基因组去甲基化, 这种由于物种不同而出现的差异需要我們进行深入的研究。

随着胚胎细胞的卵裂, 小鼠母源基因组经历被动的依赖DNA复制的逐渐去甲基化过程, 发育到 8-细胞和桑葚胚的时候甲基化信号已经很低(图 3: C, D), 本实验结果同前人做的结果一样^[10]。不同的是四倍体胚胎细胞的DNA甲基化水平随着卵裂逐渐增加, 到桑葚胚阶段达到最高。这种DNA甲基化水平逐渐增加的现象可能是四倍体胚胎染色体加倍效应造成的。更加明确的原因需要进一步验证。

当小鼠二倍体胚胎发育到囊胚的时候, 体内囊胚出现了差异甲基化分布, 即滋养层细胞比内细胞团细胞甲基化水平低的现象, 这种现象被认为与后期胚胎不同胚层发育有关^[15, 16]。而小鼠四倍体囊胚滋养层细胞同内细胞团细胞没有出现这种差异甲基化分布现象。研究者使用同样的免疫组化方法发现人和兔子囊胚内细胞团也出现了差异甲基化分布现象, 与小鼠不同是人和兔子滋养层细胞比内细胞团细胞DNA甲基化水平高, 把这种矛盾解释为不同物种之间的差异^[17, 18]。小鼠四倍体囊胚同二倍体囊胚甲基化模式具有很大差异, 我们认为, 可能是四倍体囊胚细胞团细胞太少, 染色过程很难区分滋养层细胞和内细胞团细胞的缘故, 也可能与四倍体胚胎细胞具有向胚外组织发育的倾向性分布的特点有关。

有研究显示, 体外培养可能造成小鼠早期胚胎基因组甲基化缺陷^[17]。本实验通过检测体外培养小鼠二倍体早期胚胎, 发现其DNA甲基化模式同体内胚胎DNA甲基化模式并没有差异, 说明并非是体外培养体系造成的小鼠四倍体早期胚胎这种特异甲基化模式。

2004 年孤雌小鼠的诞生^[19]不仅打破了哺乳动物单性不能发育的定论, 同时也证明了保持正常印迹状态对哺乳动物胚胎发育的重要性。受此启发, 小鼠四倍体不能正常发育到妊娠足月可能也与四倍体早期胚胎的印迹状态有关。本实验室通过实时定量PCR在四倍体囊胚中没有检测到印迹基因H19 的表达(未发表)。由于早期胚胎DNA甲基化在维持早期胚胎印迹状态发挥着重要的作用^[11, 20, 21], 所以从四倍体胚胎基因组甲基化的角度进行了研究, 发现其甲基化模式同正常胚胎发育存在很大差异。这种异常的甲基化模式可能是造成四倍体胚胎不能发育到妊娠足月的原因之一。以前文献没有对小鼠四倍体早期胚胎特殊的甲基模式进行过报道。

参考文献(References):

- [1] Li GP, Cai SX, Xu LB, Tan JH. Studies on the early development of mouse tetraploid embryos produced by electrofusion. *Developmental & Reproductive Biology*, 2000, 7(1):17–23.
- [2] Snow MH. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature*, 1973, 244(5417): 513–515. [\[DOI\]](#)
- [3] Gallardo MH, Bickham JW, Honeycutt RL, Ojeda RA, Köhler N. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, 1999, 401(6751): 341. [\[DOI\]](#)
- [4] King WA. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. In: McFeely R, ed. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. San Diego CA, Academic Press, 1990, 34: 229–250.
- [5] Jacobs PA. The role of chromosomal abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev*, 1990, (Suppl. 1): 63–74.
- [6] Tang PC, Ritchie WA, Wilmut I, West JD. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts. *Zygote*, 2000, 8(1): 33–43. [\[DOI\]](#)
- [7] Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293(5532): 1068–1070. [\[DOI\]](#)
- [8] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001(5532), 293: 1089–1093. [\[DOI\]](#)
- [9] Rideout III WM, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293(5532): 1093–1098. [\[DOI\]](#)
- [10] Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. De-methylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403(6769): 501–502. [\[DOI\]](#)
- [11] Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, 2000, 10(8): 475–478. [\[DOI\]](#)
- [12] Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Pequignot EV. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev*, 1998(14), 12: 2108–2113. [\[DOI\]](#)
- [13] Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992, 69(6): 915–926. [\[DOI\]](#)
- [14] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99(3): 247–257. [\[DOI\]](#)
- [15] Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13734–13738. [\[DOI\]](#)
- [16] Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Mthtan R, Young L. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*, 2004, 14(7): R266–267. [\[DOI\]](#)
- [17] Shi W, Dirim F, Wolf E, Zakhartchenko V, Haaf T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 2004, 71(1): 340–347. [\[DOI\]](#)
- [18] Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J Jr. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction*, 2004, 128(6): 703–708. [\[DOI\]](#)
- [19] Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Perk ES, Seo JS, Oqawa H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 2004, 428(6985): 860–864. [\[DOI\]](#)
- [20] Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet*, 2001, 27(3): 255–256. [\[DOI\]](#)
- [21] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(1): 21–32. [\[DOI\]](#)